

보건분야-연구자료

연구원 2003-3-14

산업화학물질의 발암성 스크리닝을 위한 유전독성연구

- Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)와
소핵시험을 이용한 2-Bromopropane의 유전독성연구

한 국 산 업 안 전 공 단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 2002년도 산업안전보건연구원 연구사업인 “산업화학물질의 발암성 스크리닝을 위한 유전독성연구”의 연구결과 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 31일

연구주관부서 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

연구 책임자 : 선임연구원 맹 승 희

공동 연구자 : 이 용 목, 유 일 재, 김 수 진

목 차

제 1 장 서 론	1
1. 연구배경 및 목적	1
제 2 장 재료 및 방법	7
1. 화학물질	7
2. Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet assay)	8
2-1. SCGE assay (Comet assay)의 원리	8
2-2. SCGE assay의 방법	9
2-2-1. 사람 혈구 배양세포를 이용한 방법 (<i>in vitro</i>)	11
2-2-2. 실험동물 마우스를 이용한 방법 (<i>in vivo</i>)	11
가. 실험동물	11
나. 투여농도 및 방법	12
다. 골수 및 간세포의 준비	12
라. Slide preparation	13
마. Lysis	13
바. Alkali unwinding and Electrophoresis	14
사. DNA staining and Comet visualization	14
3. 마우스 골수세포에서의 소핵시험	15
4. 흰쥐 간세포에서의 소핵시험	16
4-1. 실험동물	16
4-2. 실험일정	16
4-3. 2-BP의 농도별 조제 및 투여방법	17
4-4. 간의 부분적 절제 (Partial hepatectomy)	17
4-5. 간세포 표본의 제작	18
4-6. 표본의 염색 및 소핵관찰	18
5. 통계적 분석	19

제 3 장 연구결과	20
1. SCGE assay (Comet assay)	20
1-1-1. 2-BP에 대한 in vitro 혈구세포의 생존률 산출	20
1-1-2. 2-BP에 의한 in vitro 혈구세포에서의 DNA 손상	21
1-2. 2-BP에 의한 in vivo 마우스 장기에서의 DNA 손상	25
1-2-1. 골수세포에서의 DNA 손상	25
1-2-2. 간세포에서의 DNA 손상	30
2. 마우스 골수세포에서의 소핵유발빈도	35
3. 흰쥐 간세포에서의 소핵유발	36
3-1. 동물의 관찰조건	36
3-2. 간세포에서의 소핵유발빈도	38
제 4 장 고 찰	40
제 5 장 결 론	48
제 6 장 참고문헌	51

요 약 문

1. 과 제 명 : 산업화학물질의 발암성 스크리닝을 위한 유전독성연구

2. 연구기간 : 2002 1월 1일 - 2002 12월 31일

3. 연 구 자 : 총괄연구책임자 : 맹 승 희 (선임연구원)

공 동 연 구 자 : 이 용 목 (수석연구원)

: 유 일 재 (수석연구원)

: 김 수 진 (연구보조원)

4. 연구목적

화학물질을 포함한 유해인자의 발암성을 예측하기 위한 대표적인 유전독성 시험은 시험관법 (*in vitro*)의 미생물복귀돌연변이시험, 염색체이상시험이며 여기에서 양성이 의심되는 물질에 대해 생체시험법 (*in vivo*)의 평가가 필요한 경우 일반적으로 설치류 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하고 있다. 그러나 소핵시험은 세포분열성이 없는 조직을 대상으로 하는 것은 어려우므로 주로 골수세포나 말초혈액을 주로 관찰대상으로 하고 있어 장기특이성이 있는 발암물질의 스크리닝에는 그 한계점이 제시되고 있다. 최근 이러한 기존시험방법을 보완하기 위해 다양한 유전독성시험방법이 제시되고 있다.

본 연구는 화학물질의 폭로에 의한 암 발생의 초기단계 변화인 세포 내 유전독성을 평가하기 위하여, 최근 DNA사슬의 분절, DNA 손상 등을 스크리닝

하는데 새로운 유전독성시험방법으로서 제기되어 국제적시험가이드라인 등에 포함시키기 위해 각국 연구자들이 시험방법에 대한 통일화 (harmonization)를 추진하고자 하고 있는 단일 세포 겔 전기영동분석법 (Single cell gel electrophoresis, 일명 Comet assay)의 유용성을 할로겐화합물의 하나인 2-bromopropane에 대해 검토하고 기존의 대표적인 *in vivo* 유전독성시험법인 설치류를 이용한 소핵시험과 비교 검토하고자 하였다.

5. 연구내용

본 연구에서는, 산업장에서 용매, 세척제 등으로 널리 사용되고 있는 할로젠 화합물 (aliphatic halogenated hydrocarbon)에의 급,만성폭로가 실험동물의 다양한 장기에서 발암성 혹은 병리적 영향과 연관되어 있다는 기존의 보고들과, 최근 이들 물질 중 특히 간암과 연관된 물질의 경우 소핵시험 적용의 제한점이 있다는 보고에 따라, 최근 집단생식중독사건을 일으킨 후 생식독성물질이며 유전독성물질로서 새롭게 보고되고 있는 할로젠 화합물 2-bromopropane (2-BP)을 택하여 배양세포와 실험동물에 각각 투여, 사람의 혈구세포, 마우스의 간세포와 골수세포에 형성된 DNA 손상을 SCGE 분석을 통해 측정하는 한편, 마우스 골수세포 및 흰쥐 간세포에서의 소핵유발을 관찰함으로써 유전독성 활성을 측정하였다.

6. 연구개요

In vitro 실험에서 배양한 혈구세포에서 2-BP를 1시간 투여하여 결과 혈구세포에서의 SCGE 분석 결과, 결과치값 (tail moment)이 대조군의 것에 비해

통계적으로 유의한 수치를 나타내었으며 ($p < 0.05$) 농도 증가에 따른 양 반응성도 나타내었다.

*In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 골수세포에서 SCGE분석을 실시한 결과, 투여시간 48시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내었으며 72시간에 이르면 다시 감소하는 양상을 보여 DNA수복이 이루어짐을 제시하여 주었다.

*In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 간세포에서 SCGE분석을 실시한 결과 투여시간 3시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내었으며 3시간 이후로는 DNA수복이 이루어짐을 나타내었다.

*In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 골수세포에서의 소핵유발 빈도는 음성대조군에 비하여 차이를 나타내지 않았다.

*In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 흰쥐 간세포에서의 소핵유발빈도는 음성대조군에서의 것보다 통계적으로 유의하게 상승하여 간의 부분 절제를 통해 간세포분열을 유도하여 실시한 *in vivo* 간세포 소핵시험에서 양성의 결과를 나타내었다.

이상의 결과에 따르면 2-BP의 발암성 및 유전독성을 스크리닝하기 위하여 SCGE 분석법 (일명 Comet assay)이 소핵시험보다 더 유용성 있는 것으로 검토되어, 본기법의 유전독성시험법으로서의 유용성을 확인하였다. 또한 유사한 할로젠화합물의 노출 근로자 스크리닝에 대한 본 기법의 활용성을 나타내었다. 한편, 2-BP의 표적장기로서 생식계 뿐 아니라 간장도 감수성이 있는 표적장기임을 검토하였다.

7. 중 심 어

2-Bromopropane, Single Cell Gel Electrophoresis (Comet assay),
micronucleus, partial hepatectomy

제 1 장 서 론

1. 연구배경 및 목적

화학물질을 포함한 유해인자의 발암성을 예측하기 위해 지금까지 흔히 사용되고 있는 유전독성시험은 미생물을 이용한 Ames시험과 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상을 대표적으로 들 수 있다. 이들 *in vitro*의 시험법에서 양성이었던 화합물에 대해 *in vivo*의 시험법에서 평가할 필요성이 있는 경우 마우스를 이용한 소핵시험을 일반적으로 실시하고 있다.

*in vivo*의 염색체이상을 검출하기 위한 소핵시험은 실험방법이 비교적 간편할 뿐 아니라 배경 데이터가 풍부하여 그 유용성이 높은 것으로 평가되고 있다. 그러나 소핵시험은 골수세포와 말초혈액세포를 주로 관찰대상으로 하고 있어 그 한계점이 지적되기도 하였다 (Morita *et al.*, 1997). 특히 *in vitro* 염색체 이상시험에서 양성이나 소핵시험에서 음성인 경우, 시험물질이 표적이 되는 골수세포에 도달하지 않아서 독성 검출이 되지 않는 것도 간과할 수 없는 것으로 생각되어 최근에는 재생 간 및 장기를 이용한 소핵시험을 실시하고 있으나 염색체이상의 유발을 지표로 하기 때문에 세포분열성이 없는 조직을 대상으로 하는 것은 불가능하여 일반적으로 조혈조직 이외에서 실험실시가 곤란하다고 평가되고 있다. 또한 발암물질에는 장기특이성이 있는 것으로 알려져 있다 (Tennant & Ashby, 1991). 마찬가지로 화학물질의 작용 또한 장기 특이성이 있을 것을 생각할 때 혈구 세포에 생긴 염색체 이상만을 관찰하는 소핵시험만으로 생체내의 화학물질의 활성을 파악할 수 없음이 분명하다. IARC는 사람에

대한 발암물질로 정한 물질 중 마우스 골수 소핵시험의 결과 음성이었던 물질의 발암부위를 조사해 보았는데 (Benigni, 1990) 간에 특이적으로 암을 일으키는 물질 중 골수를 이용한 소핵시험으로 검출할 수 없는 물질이 많았다.

이와 같은 기존 시험방법의 제한점을 보완하고 여러 원인에 의해 유발되는 DNA 손상을 감지하기 위한 시험방법이 많이 개발되어 왔는데 이들 중 최근 간부분절제를 통해 분열을 유도하여 실시하는 간세포 소핵시험이며 소핵시험 자체를 대체하기 위한 제기되는 alkaline single cell gel electrophoresis assay (alkaline 단세포겔전기영동법, alkaline SCGE법, Comet assay)가 주목을 받고 있다.

화학물질에 대한 여러 국제기구 및 각 국의 규제시험 가이드라인에서 제시되고 있는 통상 골수세포에서의 소핵시험의 특이도 및 신뢰성의 문제가 제기되는 가운데 골수 세포를 이용한 소핵시험에서 음성의 결과를 나타내었던 화학물질들이 간세포를 이용한 소핵시험에서 양성의 결과를 나타내는 보고들 (Noguchi *et al.*, 1994; Herens *et al.*, 1995)이 있어 이 방법의 장단점 및 활용가능성에 대해 고찰할 필요성이 제기되어 왔다. 소핵시험에서 간세포를 택할 경우의 장점은 골수와 달리 간조직은 발암현상에 간접적으로 작용하는 물질 예를 들어 특정한 간효소에 의한 대사활성을 요구하는 물질에 대해 높은 민감도를 나타내므로 그 장점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Benning *et al.*, 1992). 단지 *in vivo*의 방법으로 간세포를 이용하는 실험방법에는 분열촉진 (mitotic stimulation)을 유도해야 하는 문제점이 있어 부분적 간절제 (partial hepatectomy)를 해야하는 실험의 복잡성 및 기술적 어려움이 있기도 하다.

SCGE assay (Comet assay)는, DNA 손상을 DNA 사슬 절단과 알칼리 감수성 부위로 검출하는 방법이며, 염색체이상을 지표로 한 것은 아니므로 분열

성 조직이 아닌 것의 DNA손상도 검출이 가능하다 (Fairbairn *et al.*, 1995). 이 방법은 분자 독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 적용되는 최신기법으로 Ostling & Johanson (1984)에 의해 각 세포 수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법으로 Dr. Singh (1988)에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지할 수 있는 방법으로 개발되었다.

이러한 SCGE assay는 빠른 시간 내에 간편하게 각각의 단일세포수준에서의 자료를 얻을 수 있어 DNA 손상을 유발할 수 있는 물질에 대해 인구집단에서의 저항성이나 민감도를 측정할 수 있고, 적은 수의 세포에서 실험가능하고 DNA 손상을 감지하는데 민감하며 10^9 dalton당 0.1 DNA breakage를 감지할 수 있는 매우 유용한 장점을 지니고 있다. 또한 세포주기 위치에 영향을 받지 않는 것으로 보고되어 (Mckelvey-Martin *et al.*, 1993) 동시화시켜 배양한 세포에 적용가능하고 세포주기 stage가 동일할 필요가 없는 primary 세포에서도 가능하다.

SCGE assay의 적용 가능한 범위는 아주 다양하여 산소 라디칼의 형성에 의한 DNA손상과 항산화제의 관계 등을 쉽게 관찰할 수 있다 (Anderson *et al.*, 1994). 이것은 또한 인간집단에서의 산화적 손상, UV (Gedik *et al.*, 1992), ionizing radiation등에 대한 DNA break를 스크리닝할 때에도 유용하게 사용할 수 있다 (Fairbairn *et al.*, 1995).

유전독성분야에서 특정세포에 관련한 대사활성과 *in vivo*에서 물질 투여 경로에 따른 양반응관계 등의 연구에도 적용가능하며, 동물에 실험물질을 다양한 경로를 통해 투입, 짧은 기간 동안 노출시킨 후 세포를 분리하여 생존율을 측정 후 본 SCGE를 실시할 수 있어 *in vivo*에서 물질에 따른 특정 장기에서의 작용을 쉽게 평가하는데도 사용될 수 있다.

또한 DNA 손상 후 유발되는 2차적 세포방어기전으로의 수복과 apoptosis에 대한 연구에 있어서도 본 시험법을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 단일세포 각각의 DNA 손상을 민감하게 정량화 할 수 있다는 장점으로 많은 연구자들이 세포주나 혈구를 대상으로 특정 물질에 대한 수복활성을 측정하거나 다양한 유전독성물질에 대한 수복의 작동형태에 대해 발표하였다 (Collins *et al.*, 1995; Fortni *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1990).

Aliphatic halogenated hydrocarbon 들은 산업장에서 용매, 세척제 (degreasing agent) 등으로 널리 사용되고 있는 것으로 작업장 근로자에게 잠재적 위험성을 나타낼 것으로 판단, 최근까지 짧은 사슬로 된 halogenated hydrocarbon 물질에 실험적으로 급성, 아만성 및 만성적으로 폭로되는 것이 실험동물의 다양한 장기에서 다양한 변이원성, 발암성 혹은 병리적 영향과 연관되어 있음이 증명되어 왔다 (Weisburger, 1997; NTP, 1993; Storer *et al.*, 1995). 이들 보고에 의하면 이들 화합물의 다수의 경우 위와 같은 유해성을 일으키기 위해 높은 반응성의 중간체, 자유라디칼 혹은 안정되어 있으나 독성의 대사체로 생물전환 (biotransformation)된다. 이러한 halocarbon이 생물전환하는데 있어서 두 가지 주요 효소류가 관여하는데는 glutathione S-transferase와 cytochrome P-450에 의존하는 혼합기능의 산화제가 그 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Ivanetich & Honert, 1981; Blocki *et al.*, 1994).

Tafazoli 등 (1996)은 halogenated hydrocarbon류의 구조에 있어서 염소치환의 수 혹은 이중결합의 유무에 따라 이들 화학물질의 유전독성활성에 질적 및 양적 차이가 있다고 보고하였다. 이들은 같은 연구에서 5가지 halogenated hydrocarbon에 대해 사람 림프구를 이용하여 *in vitro*의 방법으로 소핵시험과 SCGE assay를 실시하여 이들 결과를 비교분석하였는데 두 기법이 서로 다른 endpoint를 감지하기는 하지만 할로겐 화합물의 유전독성을 스크리닝하기 하기

에 SCGE assay가 소핵시험보다 좀더 적절하며 민감한 방법임을 제시하였다.

2-Bromopropane (2-BP; CAS No. 75-26-3)은 halogenated propane 물질의 하나이다. 전자회사에서 Freon의 대체물질로 사용되었으나 1995년 경상남도 양산의 전자부품회사에서 2-BP를 함유한 solvent 2000에 노출되었던 근로자들에 있어서 무월경, 정자감소증, 무정자증 및 빈혈과 같은 증상을 집단적으로 나타내어 문제를 일으킨 이후 2-BP에 대한 독성연구가 활발하게 이루어져 왔다. 단면 조사 연구에 의하면 2-BP를 97.4%함유하고 있던 solvent 5200이 이러한 생식독성의 원인 물질이었음을 밝혀졌으며 (Kim *et al.*, 1996), 2-BP에 노출된 여성근로자에서 atrophic cortex에서 follicle 생성 혹은 발달이 억제되어 primary ovarian failure를 일으키며 (Koh *et al.*, 1998), 남성 근로자에서는 정자 감소증이 주된 독성영향이였음이 보고되었다(Park *et al.*, 1997).

2-BP의 유전독성에 관하여서는 Maeng & Yu (1997)가 Salmonella TA 100과 TA 1535에서 미생물 복귀돌연변이를 일으키나, 포유류배양세포에서 염색체이상을 일으키지 않았고, 28일 반복투여한 흰쥐 골수 세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 보고하였다. 한편 Ishikawa 등 (2001)은 2-BP를 투여한 마우스의 착상전 태아 배 (preimplantation mouse embryo)에서 소핵 형성을 유발하였음으로 보고하였다. 또한 Li 등 (2001)은 2-BP가 수컷 흰쥐에서 정자형성과정 (spermatogenesis)중 생식세포의 apoptosis를 일으킴을 보고하였다.

본 연구에서는 위에 언급한 것과 같이 기존의 유전독성시험법 중 설치류를 이용한 소핵시험이 소핵을 관찰하는 세포의 표적장기에 따라 그 결과가 상이할 수 있다는 제한점과 소핵시험 자체의 민감성, 특이성을 고려하여, 생식독성 물질이며 유전독성물질이라고 보고된 2-BP를 택해 세포의 DNA 손상을 측정할 수 있는 단세포 겔 전기영동분석법 (SCGE assay, Comet assay)을 배양한 림프구 및 2-BP를 복강투여한 마우스의 골수세포와 간세포에서 실시하고 그

결과를 비교 분석하고자 하였다. 또한 2-BP를 복강내 투여한 마우스 골수세포에서의 소핵유발과, 흰쥐를 이용하여 간 부분절제를 통해 세포분열을 유도한 간세포에서의 소핵유발결과를 비교하고자 하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 화학물질

연구대상물질인 2-bromopropane (CAS No. 75-26-3; Lot No. FGA01)은 일본의 東京化成(株)에서 구입하여 사용하였으며 그 순도는 99%이었다. 음성 대조물질로 사용한 DMSO (Lot No. 100K0141) 및 corn oil (Lot No. 70K0127)은 Sigma Chem. Co.에서 구입하여 사용하였다. Comet assay를 위한 normal melting agarose와 low melting agarose는 Bio-Rad (Richmond, CA)와 Amresco Co.에서 각각 구입하였다. Mincing 용액으로 사용한 HBSS는 GIBCO (Lot No. 1130187)에서, Histopaque-1077은 Sigma Chem. Co.에서 구입하여 사용하였다.

간세포 소핵표본을 위해 간관류액의 조제시 사용한 EGTA [ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid], HEPES (N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2etgabsykfibuc acid), collagenase, trypsin inhibitor 그리고 간세포내 핵 및 소핵의 형광염색액으로 사용한 DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihydro chloride)등의 시약은 Sigma Chem. Co.의 것을 사용하였다.

2. Single Cell Gel Electrophoresis Assay (COMET assay)

본 연구를 위한 alkaline (pH>13) SCGE assay 방법은 DNA single strand break, alkali-labile site 및 crosslink의 발생을 감지하기 위해 Singh 등 (1988)이 생화학적으로 개발하였던 방법을 기초로 하여 *in vitro* 그리고 *in vivo*의 연구에서 진핵세포에서 DNA손상을 탐지할 목적으로 Tice *et al.* (2000)이 고안한 방법에 따라 아래와 같이 실시하였다.

2-1. SCGE assay (Comet assay)의 원리

세포의 핵 안에 존재하는 DNA histone 단백질과 단단히 결합되어 심하게 꼬여 (supercoiled) 모여 있다. 강한 염으로 용해 과정 (lysis)을 거치면 핵단백질이 빠져 나가게 되어 핵모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 핵양체 (nucleoid) 형태가 되며, supercoiling의 상태가 완화되어 open loop 구조를 이루게 된다. 이때 핵양체내에 DNA사슬의 분절 (strand breakage)이 있는 경우 alkali 상태에서 DNA 염기쌍이 분리되면서 DNA 가닥이 서로 분리되고 분자의 양쪽 끝이 서로 풀리게 되면서 구조가 변형된다. 일반적으로 sensitive detection을 위해 이중가닥으로 된 DNA를 푸는 과정을 거친다. 이때 pH 12.3 이상의 강한 알칼리 용액을 사용하게 되는데 이것으로 DNA변성, 사슬풀기, 외사슬의 발현을 촉진한다.

Comet 형성의 패턴을 결정하는데는 두가지 원리가 설명되고 있는데, 첫째는 핵양체내에 DNA사슬분절이 있는 경우 supercoiling 상태가 완화되고 결과적으로 느슨해진 DNA loop의 음극이 외부로 노출되어 전기영동시 양극 쪽으로 이동되어 원래 구조로 부터 확장된 tail의 형태를 보임으로써 gel

electrophoresis에 의해 쉽게 감지될 수 있도록 하는 것이다. 즉 Comet assay에서 생긴 tail은 이렇게 생성된 loop들이며 loop의 수가 DNA break의 수를 나타내는 것이다. 이 원리모델은 DNA 손상이 많을수록 tail의 길이보다는 밀도의 증가와 관계있고 tail의 길이가 loop의 길이에 의해 주로 결정된다는 사실과 잘 부합하며 낮은 DNA 손상정도에서도 일어나기 쉬운 모델이다. 두 번째는 DNA 분절이 일어나는 경우 DNA 절편 (fragment)들이 생겨 이것 역시 음극부위가 노출되어 이 절편들이 양극쪽으로 끌려가서 tail이 형성된다는 것이다. 이때 분자량이 작은 절편일수록 핵에서 멀리 이동하게 될 것이며, DNA break의 수가 증가함에 따라 DNA fragment들이 tail 쪽으로 이동하게 되고 이것이 극에 달하면 head와 tail이 분리되는 현상 (apoptosis)을 나타내게 된다.

본 연구에서는 tail moment값이 DNA손상정도와 상관관계가 높았다는 보고 (Olive & Barnath, 1995)에 따라 전자의 원리모델을 채택하여 Olive tail moment를 측정함으로써 DNA손상정도를 나타내었다.

2-2. SCGE assay의 방법

본 연구에서는 실험방법의 민감성을 높이기 위해 즉 DNA내의 수소결합을 쉽게 풀고, AP (apurinic site)가 빠르게 분절되며 외사슬분절(Single strand break)의 발현을 극대화시키기위해 전문가 panel에서 합의하였던 방법 (Tice *et al.*, 2000)인 Alkaline Single Cell Gell Electrophoresis 법을 하는 채택하였다 (Figure 1).

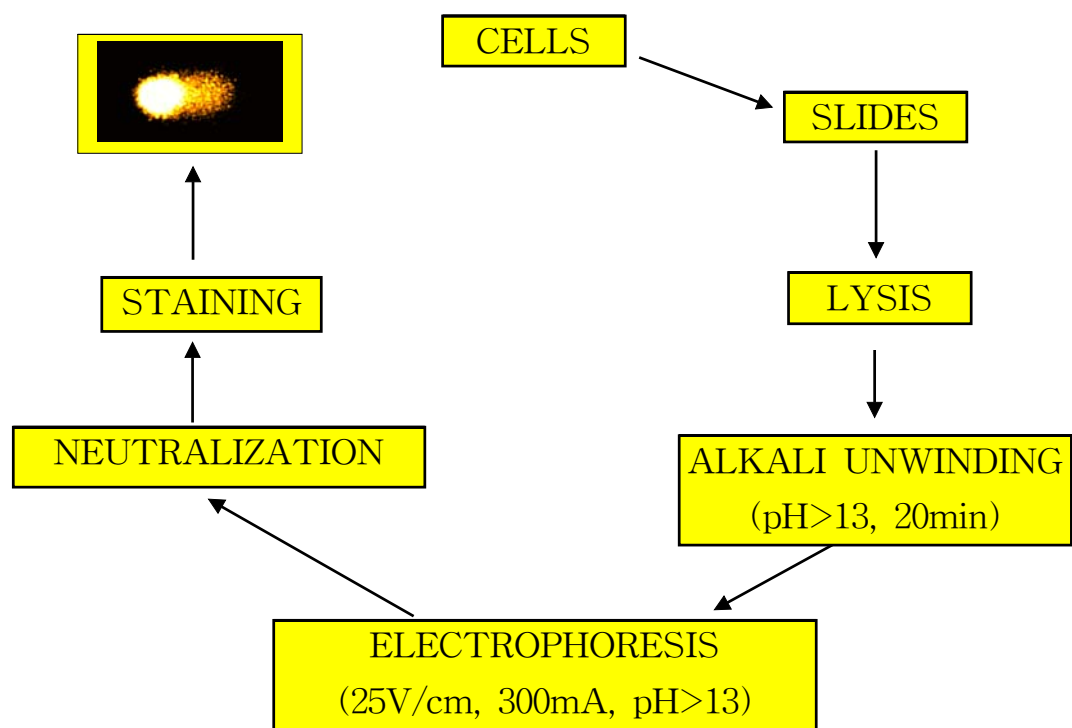


Figure 1. Schematic representation of critical steps in alkaline (pH > 13) SCGE assay

2-2-1. 사람 혈구 배양세포를 이용한 방법 (*in vitro*)

*In vitro*의 실험을 위해서는 사람의 혈구세포를 배양하여 연구대상으로 하였으며, 2-BP의 처리농도는 예비시험을 통해 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 mM로 하였다. 농도별 조제를 위한 용매와 음성대조물질은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 또한 양성 대조물질로는 200 μ M 농도의 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 이용하였다.

건강한 성인의 정맥혈에서 헤파린 처리된 튜브에 채혈한 전혈 30 μ l와 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640 배지 465 μ l에 농도별로 조제한 2-BP 5 μ l씩을 처리하여 총 volume 500 μ l가 되게 한 후 CO₂ 배양기에서 1시간 배양함으로써 혈액림프구에 2-BP를 노출시켰다. 배양이 끝난 후 110 μ l의 실온 Histopaque 1077을 각각의 배양튜브 바닥에 서서히 넣어 2000 $\times$ g의 속도로 5분간 원심분리시켰다. 단핵세포층 100 μ l를 수거하여 새로운 튜브에 옮긴 다음 FBS를 포함하지 않은 RPMI 1640으로 2번 수세함으로써 Comet assay을 위한 세포를 준비하였다.

2-2-2. 실험동물 마우스를 이용한 방법(*in vivo*)

가. 실험동물

실험동물은 7주령의 특정 병원체 부재동물 (specific pathogen free, SPF)인 수컷의 ICR 마우스를 바이오제노믹스(주)에서 분양 받아 barrier system의 청정 동물실에서 1주간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 사용하였다.

순화시킨 동물들은 체중을 지표로 하여 체중편차가 최소화 되도록 해서 군

분리를 실시하였는데 먼저 대조군, 저농도군, 중농도 및 고농도군으로 구분하고, 투여 후 도살까지의 시간군은 Sasaki 등 (1998)의 보고를 참조로 하여 3시간, 8시간, 24시간, 48시간, 72시간 군별로 하였다. 또한 음성대조군과 양성대조군을 두었으며, 이때 각 군당 5마리씩 할당하였다.

실험동물의 사육환경 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 35-60%, 환기횟수는 11-12/시간, 압력은 -9 ~ -11 mmAq (음압), 조명은 150 - 300 Lux로 12시간으로 하였으며, 사용한 사료는 실험용 멸균사료 (제일제당 주식회사)를, 음수는 멸균 정제수를 자동급수로 하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

나. 투여농도 및 방법

본 연구에서의 투여농도는, RTEC (NIOSH, 2000)의 자료를 참조로 하여 불 때 마우스 복강 투여시 반치사량이 4,837 mg/kg b.w.임을 고려, 반치사량의 약 1/2농도인 2,500 mg/kg b.w.를 투여 최고농도로 하였으며, 중농도군은 1,250 mg/kg b.w., 저농도군은 625 mg/kg b.w.으로 하여 복강내 투여하였다. 투여시간은 3, 8, 24, 48 및 72시간군을 두었다. 음성대조군은 투여시간 0시간의 실험군으로 하였으며, 양성대조군으로는 cyclophosphamide 4시간 투여군을 두었다.

다. 골수 및 간세포의 준비

골수세포의 획득을 위해서는 실험동물의 대퇴골을 절취하여 1ml의 주사기를 사용, 골수세포를 1 ml의 냉각 (4°C) mincing 용액 (Hank's Buffered Saline sol., 20 mM EDTA, 10% DMSO함유)으로 perfusion 시켜 소형 원심관

에 수집하여 SCGE 분석할 세포를 준비하였다.

간세포의 획득을 위해서는 실험동물의 간 조직을 절취하여 상기의 냉각 mincing 용액 1 ml을 넣고 10 ml teflon pestle로 homogenize시켰다. Mincing 용액으로 다시 세척한 다음 5분간 얼음에 두어 세포를 가라 앉혀 두었다.

라. Slide preparation

Comet assay를 위해 보통은 하루 전에 먼저 깨끗한 투명 slide glass를 아직 뜨거운 상태의 1% normal melting agar (NMA)에 담갔다가 꺼내어 슬라이드 밑쪽의 agarose를 제거하고 평평한 곳에 놓아 건조시켜 slidebox에 보관하여 두었다. 앞에서 미리 준비하여 둔 혈액림프구, 골수세포, 간세포 현탁액의 상등액을 가능한 한 제거한 세포현탁액 5-10 μ l에 37°C water bath에서 데운 0.5% LMPA (low melting-point agarose) 75 μ l를 넣고 섞은 것을 NMA coating 시킨 slide glass 위에 점적하고 cover glass (24 × 50 mm)로 덮어 세포액을 펼친 다음 냉장고 (4°C)에 넣어 10분간 굳혔다.

마. Lysis

Cover glass를 제거하고 0.5% LPMA을 점적하고 다시 cover glass를 덮어 냉장고에 넣어 10분간 굳혔다. cover glass를 제거하고 미리 조제하고 냉장 보관하여 두었던 lysis 용액 (2.5 M NaCl + 100 mM EDTA + 10 mM Trizma base)에 slide glass를 넣고 빛을 차단시켜서 1시간이상 lysis 시켰다.

바. Alkali Unwinding and Electrophoresis

Lysis가 끝난 표본에 남은 detergent와 salt를 제거하기 위해 Tris로 5분간씩 3회 세척하여 전기영동기에 배열하였다. pH 13의 전기영동용 완충용액 (300 mM NaOH + 1 mM EDTA)을 slide glass가 잠기도록 하여 DNA unwinding과 alkali-labile damage가 드러나도록 20분간 방치하였다. 다시 20분간 25V, 300 mA의 조건으로 전기영동을 실시한 후 neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5)로 표본 슬라이드를 5분간씩 3번 세척하였다. 냉각 100% 에탄올 (-20℃에 보관)이 담긴 couplin jar에 5분간 탈수하여 공기 건조하였다.

사. DNA staining and Comet visualization

DNA 손상정도를 가시화하기 위하여 형광물질 (ethidium bromide, 10× stock solution : 20 µg/ml)로 염색한 DNA를 형광현미경으로 20-40배율로 관찰하였다. 또한 SCGE자료를 정량화하기 위해서는 Komet analysis system 4.0 (Kinetic Imaging, Ltd., Liverpool, UK)을 CCD camera에 연결하여 migrated 된 DNA의 %와 migration length를 측정하였다. 이 소프트웨어 프로그램으로 Olive tail moment (Olive & Banath, 1993)를 계산함으로써 DNA 손상정도를 나타내었으며 각 농도군 당 *in vitro* 실험의 경우는 60개의 세포를, *in vivo* 실험의 경우는 100개의 세포를 임의적으로 관찰 분석하였다 (Figure 2).

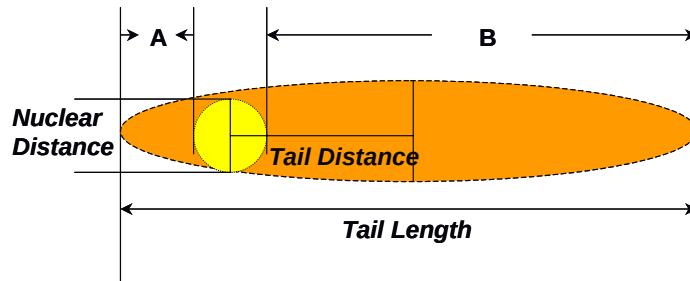


Figure 2. The definition of parameter of comet assay in Komet 4.0 analyzer.
 $A+B = \text{DNA migration}$
 $\text{Olive Tail Moment} = \text{Tail Distance} \times \% \text{DNA in Tail}$
 $\text{Tail Distance} = \text{Center position of tail} - \text{Center position of head}$

3. 마우스 골수세포에서의 소핵시험

본 연구에서 SCGE assay를 수행하였던 동일한 마우스에 대해 골수세포에서의 소핵유발을 동시에 관찰하였는데 관찰한 투여시간은 24시간 및 48시간에 대한 것이었다. 소핵시험의 기본적 실험기법은 화학물질의 유전독성시험법으로 제시되어 있는 통상의 가이드라인 (CSGMT, 1990, OECD, 1997)에 따라 실시하되 도말 표본의 염색은 Hayashi 등의 방법 (1983)으로 acridine orange로 형광염색하여 2,000개의 다염성 적혈수에서 소핵을 가진 다염성 적혈구의 빈도를 산출하였다.

4. 흰쥐 간세포에서의 소핵시험

4-1. 실험동물

실험동물은 6주령의 특정 병원체 부재동물 (specific pathogen free, SPF)인 수컷의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 바이오제노믹스(주)에서 분양 받아 barrier system의 청정 동물실에서 2주간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 사용하였다.

순화시킨 동물들은 체중을 지표로 하여 체중편차가 최소화 되도록 해서 군 분리를 실시하였는데 먼저 대조군(0 mg/kg), 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg 및 1,600 mg/kg 투여군으로 구분하고, 각 군당 6마리씩 할당하였다.

실험동물의 사육환경 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 35-60%, 환기횟수는 11-12/시간, 압력은 -9 ~ -11 mmAq (음압), 조명은 150 - 300 Lux로 12시간으로 하였으며, 사용한 사료는 실험용 멸균사료 (제일제당 주식회사)를, 음수는 멸균 정제수를 자동급수로 하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

4-2. 실험일정

동물의 간세포는 세포주기 G_0 기에 머물러 있으나 일부 간조직을 제거 (partial hepatectomy)하면 증식을 시작한다. 부분적 간절제 1일 후 세포분열이 가장 빠르게 일어나므로 (Tates, 1980), 3-4일 후 간중량은 정상으로 회복됨에 따라 본 연구의 실험일정은 Figure 3과 같이 하였다. 즉 군구성 당일 농도별 2-BP를 복강내 1차 투여하고 24시간 후 간의 부분적절제를 실시하였다. 부분절제 24시간 후 2차 2-BP 투여를 한 후 다시 3일 후 간절취 및 간세포를

분리, 포르말린 고정한 후 관찰시 형광염색하였다.

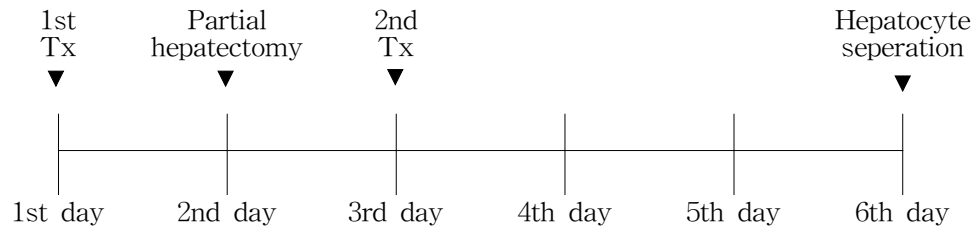


Figure 3. The experimental schedule for rat liver micronucleus assay
Tx, treatment

4-3. 2-BP의 농도별 조제 및 투여방법

농도별 2-BP는 올리브오일을 용매로 단계별 희석조제하였으며, 투여방법은 복강내 투여로 투여량은 4 ml/kg b.w.로 하였다. 투여시기는 간의 부분적 절제 전후 두 번으로 하였다.

4-4. 간의 부분적 절제 (Partial hepatectomy)

에테르로 충분히 마취시킨 동물의 사지를 고정한 후 알콜 탈지면으로 털흐름의 거꾸로 방향으로 문질러 복부 피부를 충분히 적시어 왼쪽의 검지와 중지를 펼쳐 복부의 피부를 전후로 펼쳐 가면서 면도칼로 김상돌기부위부터 복부

에 걸쳐 털을 깎았다. 노출부위의 피부 및 주변의 털을 충분히 소독한 후 검상돌기 부분에 메스를 넣어 정중선에 연하여 피부를 절개한 후 소형 핀셋으로 복강을 잡아 위로 당기면서 안과용 가위로 복강을 절개하였다. 간의 약 2/3, 즉 외측, 내측좌엽 및 내측좌엽의 3개 간엽을 손으로 눌러 근원부까지 노출시켜 근원부를 결박한 후 간을 절제하였다. 알콜로 소독후 봉합하여 수술후 10분 이내에 동물을 소생시켰다. 수술 후의 동물은 청결한 케이지에 넣어 체온이 떨어지지 않도록 주의하여 관찰하였다.

4-5. 간세포 표본의 제작

간의 부분절제 실시 4일후 실험동물을 개복하여 간문맥을 노출시키고, 미리 준비한 전관류액을 peristaltic pump를 이용, 약 14 ml/min의 유속으로 문맥을 통해 5분간 관류시켰다. 이때 하대동맥을 절단시켜 계속 관류, 하얗게 탈혈시켰다. 준비한 collagenase 용액을 같은 유속으로 7분간 관류시킨 후 간을 적출하여 collagenase 용액이 담긴 샐레닝고 간세포를 가위로 분산시켰다. 분산시킨 간세포를 가제에 여과시킨후 500g의 속도로 1분간 원심분리, 상등액을 버린 다음 냉각 Hanks 용액을 가해 원심분리시킴으로서 세척한다. 남은 간세포를 관찰할때까지 10% 중성 포르말린용액으로 고정해 두었다.

4-6. 표본의 염색 및 소핵관찰

고정된 간세포 현탁액과 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 DAPI 용액을 1:1로 섞어 slide glass에 떨어뜨려 coverglas를 올린 다음 365 nm의 UV filter가 장착된 형광현미경으로 관찰하였다. 간세포는 동물당 1,000개 이상 관찰하였다.

5. 통계적 분석

SCGE assay에서의 통계적 분석을 위해서 *in vitro*의 실험에서는 배양 반복 숫자에 *in vivo*의 경우는 각 군당 동물수에 근거하여 통계처리하였으며, 대조군과 투여군의 DNA손상정도의 차이를 통계학적으로 검정하기 위해서는 SPSS 10.0 프로그램을 이용 Kruskal-Wallis ANOVA분석 및 Mann-Whitney Rank Sum Test를 실시하였다.

골수세포 및 간세포에서의 소핵빈도에 있어서 음성대조군과 2-BP 투여군의 차이에 대한 유의성 검정은 ANOVA분석 및 Duncan의 다중비교를 실시하였다.

제 3 장 연구결과

1. SCGE assay (Comet assay)

1-1-1. 2-BP에 대한 *in vitro* 혈구세포의 생존률 산출

*In vitro*에서의 DNA손상을 측정하기 위한 농도를 설정하기 위하여 2-BP 1시간 투여시 투여농도에 따른 혈액내 혈구세포 (mononuclear cell)의 생존율을 산출하였는데 Figure 3과 같았다. 10 mM이상의 농도에서는 세포 독성을 나타내었으며 2.5 mM에서 세포생존율 약 70%, 즉 세포독성 약 30%에 이르러, SCGE 분석을 통한 DNA 손상 측정을 위한 최고농도를 2.5 mM로 설정하였다 (Figure 4).

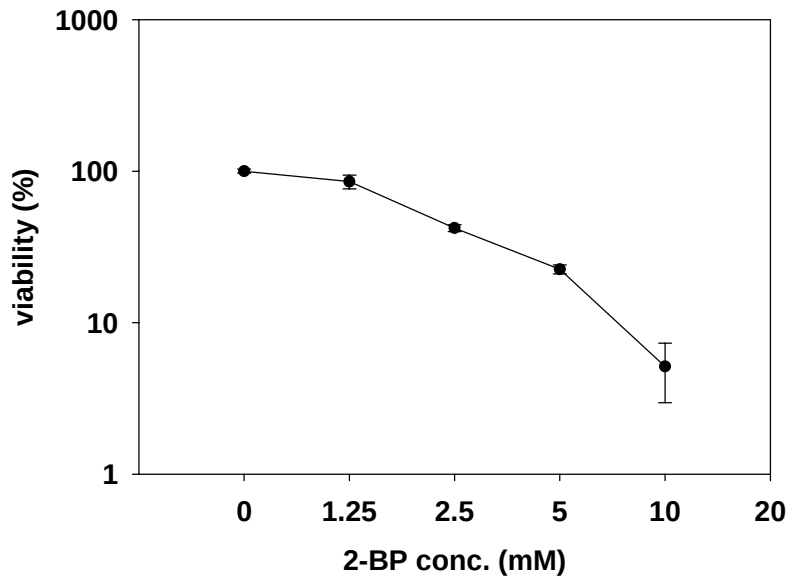


Figure 4. Cell viability of the blood cells treated with various concentrations *in vitro*

1-1-2. 2-BP에 의한 *in vitro* 혈구세포에서의 DNA손상

3회에 걸쳐 반복 실시한 *in vitro*의 실험에 있어서, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 mM의 농도로 2-BP를 배양 혈구세포에 1시간 노출시킨 세포에 생성된 DNA손상정도는 Table 1 및 Figure 5와 같았다.

음성 대조군에서 형성된 Olive tail moment의 총 평균은 0.77 ± 0.12 이었으며 양성대조물질로 사용한 200 μM 의 H_2O_2 을 투여한 실험군에 형성된 tail moment의 평균은 5.51 ± 0.83 으로 음성대조군에 비해 DNA손상정도가 통계

적으로 유의하게 상승함으로써 본 실험의 신뢰성을 보여 주었다.

2-BP를 투여한 세포에서의 tail moment 값은 모든 처리농도에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 수치를 나타내었으며, 농도증가에 따른 양 반응성도 나타내었다.

Table 1. DNA migration (mean tail moment) in human blood cells after 1 hour treatment with 2-BP *in vitro*.

Concentration of 2-BP (mM)	Mean tail moment (a.u.)			Grand Mean Tail Moment $\pm$ SD
	1st culture	2nd culture	3rd culture	
0	0.77	0.80	1.00	0.77 ± 0.12
0.01	1.83	1.78	2.06	$1.83 \pm 0.15^*$
0.05	1.86	2.27	2.00	$1.86 \pm 0.20^*$
0.10	2.09	2.51	2.08	$2.09 \pm 0.25^*$
0.25	3.04	3.00	3.42	$3.04 \pm 0.23^*$
0.50	4.22	4.21	4.74	$4.22 \pm 0.30^*$
1.00	4.32	3.96	4.76	$4.32 \pm 0.40^*$
2.50	8.65	8.33	9.31	$8.65 \pm 0.50^*$
H ₂ O ₂ (200 μ M)	6.46	4.97	5.11	$5.51 \pm 0.83^{**}$

* $p < 0.05$ significant difference between treated and untreated groups in Kruskal-Wallis ANOVA.

**, $p < 0.05$, Mann-whitney Rank Sum Test

a.u., arbitrary unit

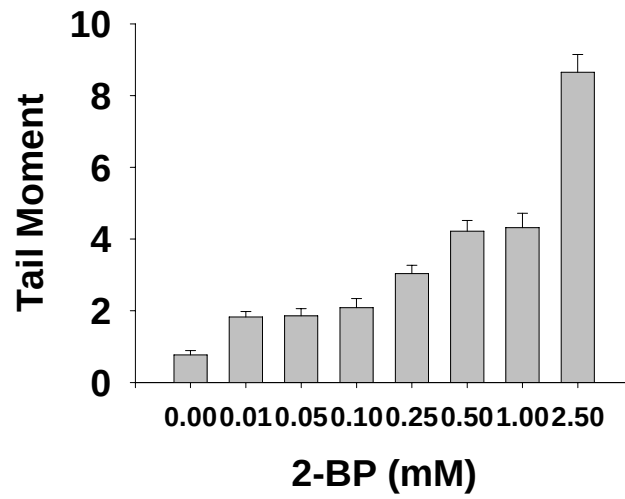


Figure 5. Dose-dependent increase in levels of DNA damage induced by 1-hour treatment of 2-BP

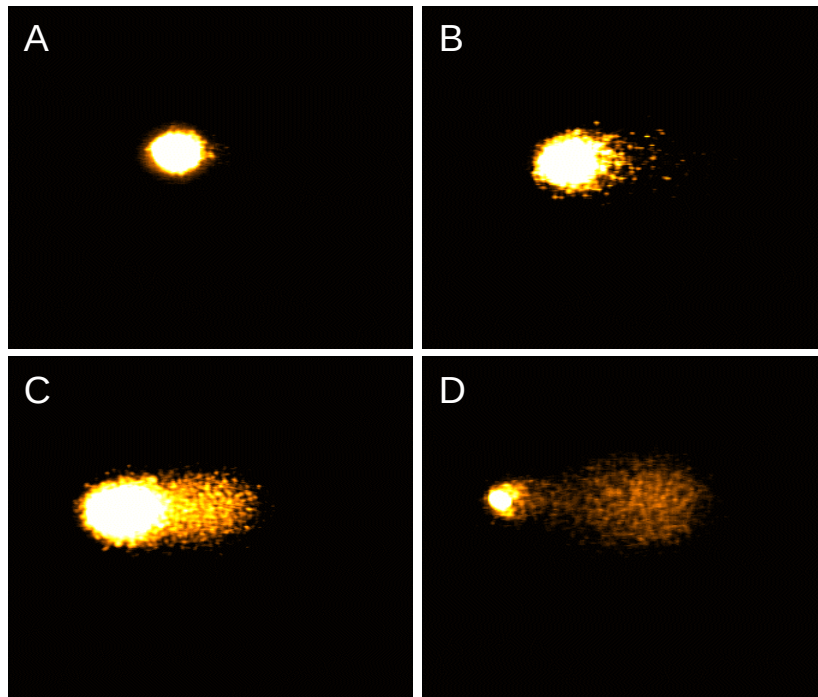


Figure 6. Digitized comet images taken from microscopic images of human blood cells
(A) untreated showing no DNA damage
(B-C) treated with 2-BP showing DNA damage
(D) treated with 2-BP showing separation of head and tail by the cytotoxicity

1-2. 2-BP에 의한 *in vivo* 마우스 장기에서의 DNA손상

1-2-1. 골수세포에서의 DNA 손상

2-BP를 복강 내에 농도별로 단회 투여 3, 8, 24, 48 및 72시간 후 생성된 마우스 골수세포에서의 DNA 손상정도는 Table 2, Figure 7 및 8과 같았다. 음성대조군에서의 mean tail moment 값이 1.48 ± 0.22 인 것에 비해 양성대조물질인 cyclophosphamide (CYP)를 4시간 투여한 마우스의 골수세포에서 8.67 ± 0.87 의 값을 보임으로써 실험의 신뢰성을 확인할 수 있었다.

각 농도단계별 투여시간에 따른 결과를 살펴보면, 모든 농도단계에 있어서 투여시간 48시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내어 625 mg/kg의 2-BP를 투여한 실험군에 있어서는 7.06 ± 1.17 , 1,250 mg/kg의 실험군에서는 8.91 ± 2.86 , 2,500 mg/kg의 실험군에서는 10.22 ± 1.64 의 값을 나타내었다. 각 농도 단계별로 살펴보면 모든 시간 군에 있어서 농도에 따른 양 반응성을 나타내는 것을 알 수 있었다 (Figure 7 & 8).

또한 각 실험군에서의 tail moment 값의 분포를 살펴보면 Figure 9와 같았다. 2,500 mg/kg, 48시간 노출군에서 가장 전형적으로 tail moment의 값이 고루 분포되어 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 9).

Table 2. Mean tail moment values of DNA isolated from bone marrow of mice treated with 2-BP (100 cells per organ, five animals per dose group)

Chemical (mg/kg)	Treatment time (h)	Mean tail moment $\pm$ SD
Negative control	0	1.48 $\pm$ 0.22
2-BP 625 mg/kg	3	2.89 $\pm$ 0.31*
	8	4.37 $\pm$ 0.83**
	24	6.87 $\pm$ 2.37*
	48	7.06 $\pm$ 1.17*
	72	3.69 $\pm$ 0.69**
2-BP 1,250 mg/kg	3	5.21 $\pm$ 1.20*
	8	4.10 $\pm$ 0.56**
	24	4.79 $\pm$ 0.63*
	48	8.91 $\pm$ 2.86*
	72	4.59 $\pm$ 0.96**
2-BP 2,500 mg/kg	3	5.41 $\pm$ 0.98*
	8	4.92 $\pm$ 0.87**
	24	5.84 $\pm$ 1.92*
	48	10.22 $\pm$ 1.64*
	72	4.85 $\pm$ 0.49**
CYP 25 mg/kg	4	8.67 $\pm$ 0.87***

*, $p < 0.05$, *Kruskal-Wallis One Way ANOVA*

**, $p < 0.05$, *All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Dunnett's Method)*

***, $p < 0.01$, *Mann-whitney Rank Sum t-test*

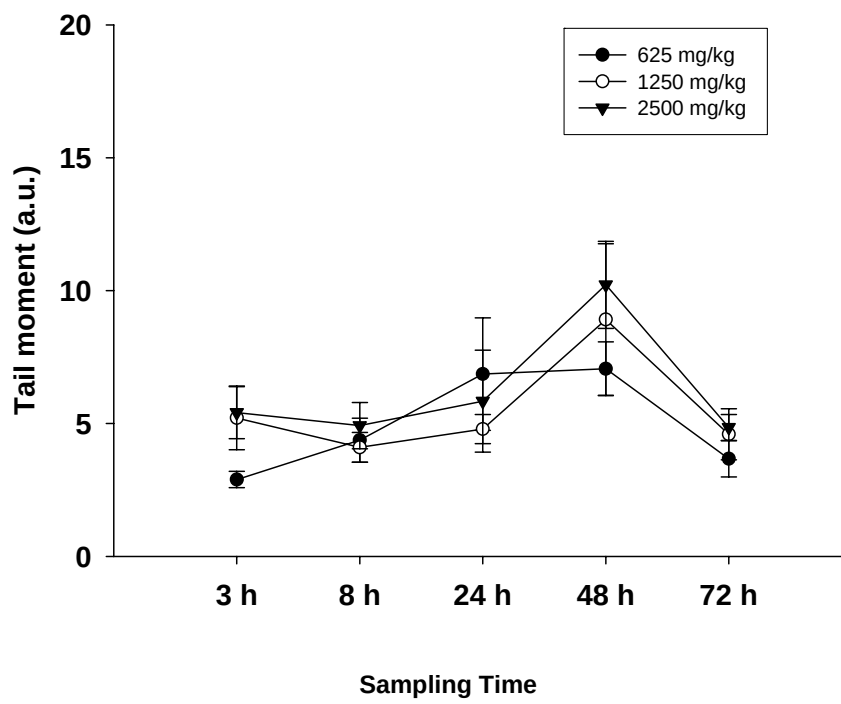


Figure 7. Changes of tail moment values with sampling time in bone marrow cells of the mice treated with 2-BP
low, 625 mg/kg; med, 1,250 mg/kg; high, 2,500 mg/kg

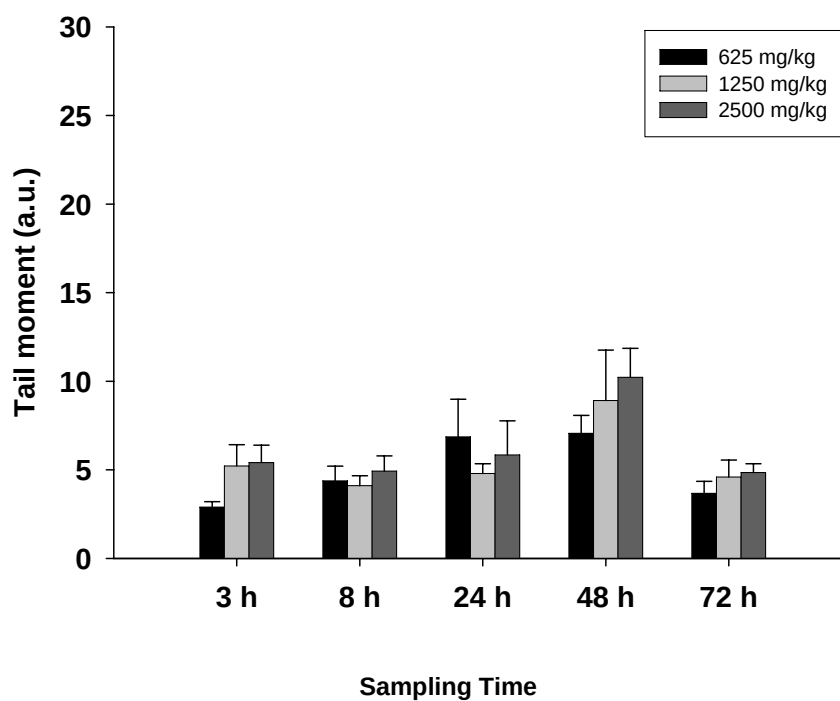


Figure 8. Dose-dependency in tail moment of bone marrow cells of mice treated with 2-BP especially in 3h, 48h and 72 hour treatment groups

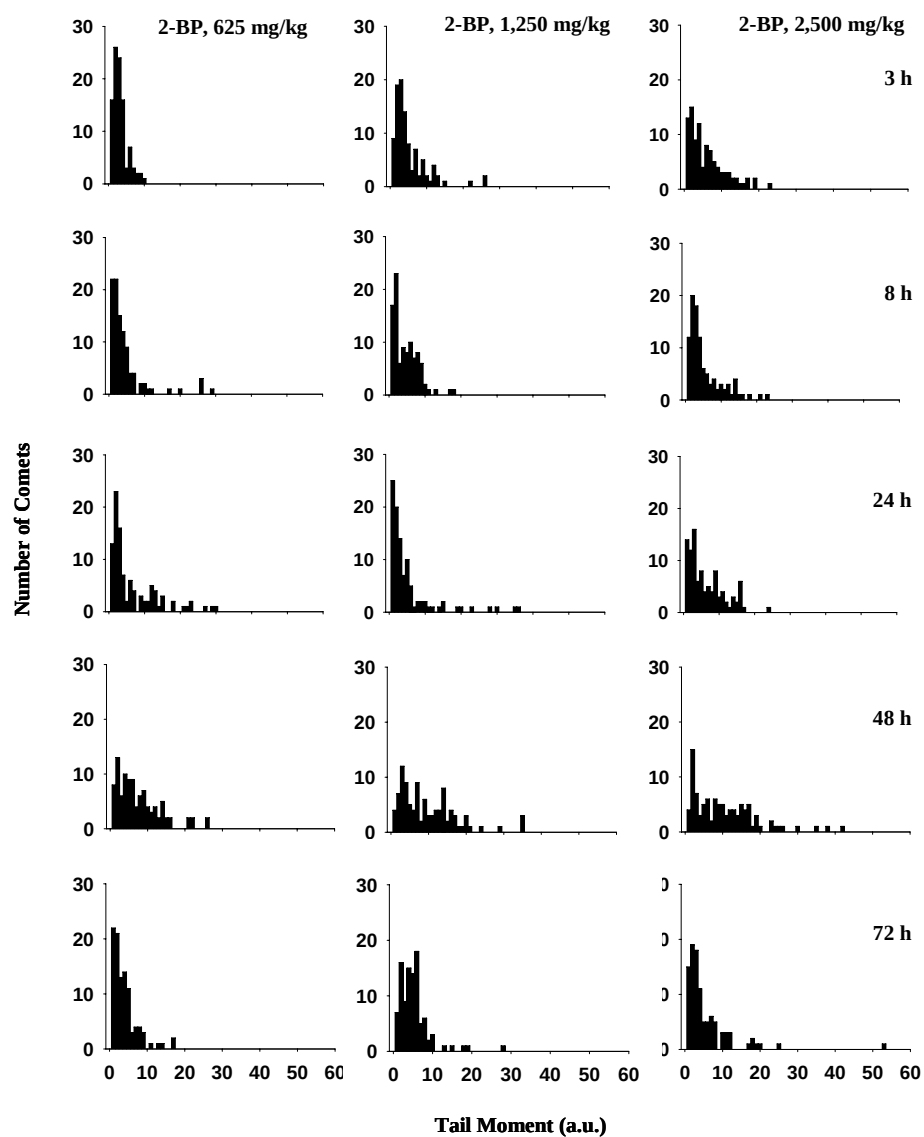


Figure 9. Representative tail moment distributions of bone marrow cells after 2-BP treatment

1-2-2. 간세포에서의 DNA 손상

2-BP를 복강 내에 농도별로 단회 투여 3, 8, 24, 48 및 72시간 후 생성된 마우스 간세포에서의 DNA 손상정도는 Table 3, Figure 10 및 11과 같았다. 음성대조군에서의 mean tail moment 값은 4.98 ± 1.66 이었으며 양성대조물질인 cyclophosphamide (CYP)를 4시간 투여한 마우스의 골수세포에서 11.98 ± 0.69 의 값을 보임으로써 골수세포에서의 값보다 높았다.

각 농도단계별 투여시간에 따른 결과를 살펴보면, 모든 농도단계에 있어서 골수세포에서와는 달리 투여시간 3시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내어 625 mg/kg의 2-BP를 투여한 실험군에 있어서는 33.02 ± 1.84 , 1,250 mg/kg의 실험군에서는 39.21 ± 2.20 , 2,500 mg/kg의 실험군에서는 44.40 ± 2.21 의 값을 나타내었다. 각 농도 단계별로 살펴보면 앞의 골수세포에서와 마찬가지로 모든 시간 군에 있어서 농도에 따른 양 반응성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Mean tail moment values of DNA isolated from liver of mice treated with 2-BP (100 cells per organ, five animals per dose group)

Chemical (mg/kg)	Treatment time (h)	Mean tail moment $\pm$ SD
Negative control	0	4.98 $\pm$ 1.66
2-BP 625 mg/kg	3	33.02 $\pm$ 1.84*
	8	18.10 $\pm$ 2.16*
	24	17.07 $\pm$ 4.89*
	48	15.92 $\pm$ 1.77*
	72	11.17 $\pm$ 1.82*
2-BP 1,250 mg/kg	3	39.21 $\pm$ 2.20*
	8	19.89 $\pm$ 3.44*
	24	19.80 $\pm$ 3.02*
	48	19.09 $\pm$ 1.98*
	72	13.49 $\pm$ 3.17*
2-BP 2,500 mg/kg	3	44.40 $\pm$ 2.21*
	8	20.63 $\pm$ 2.89*
	24	20.02 $\pm$ 4.65*
	48	19.91 $\pm$ 3.47*
	72	19.63 $\pm$ 2.73*
CYP 25 mg/kg	4	11.98 $\pm$ 0.69**

*, $p < 0.05$, All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Dunnett's Method)

**, $p < 0.01$, Mann-whitney Rank Sum t -test

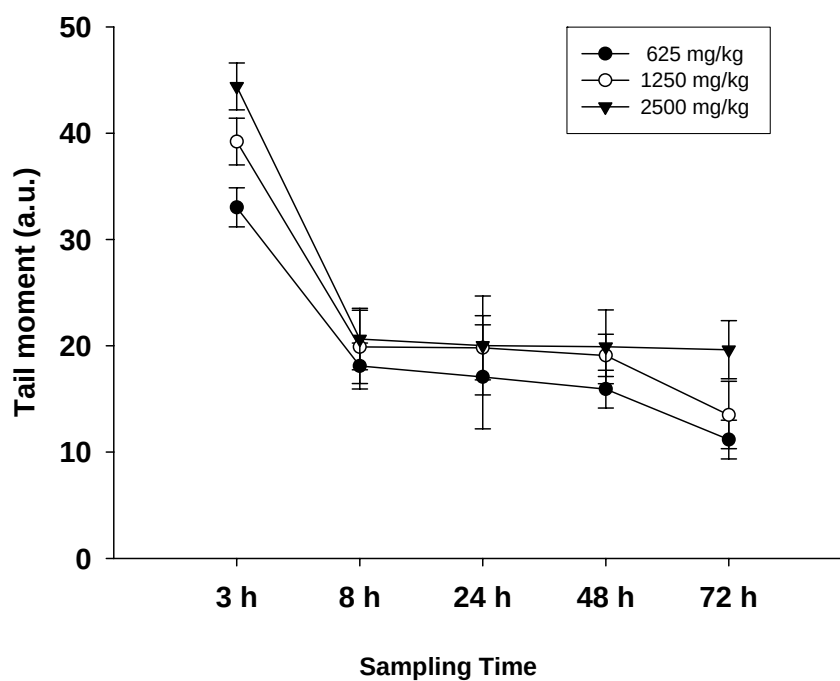


Figure 10. Changes of tail moment values with sampling time in liver cells of the mice treated with 2-BP
low, 625 mg/kg; med, 1,250 mg/kg; high, 2,500 mg/kg

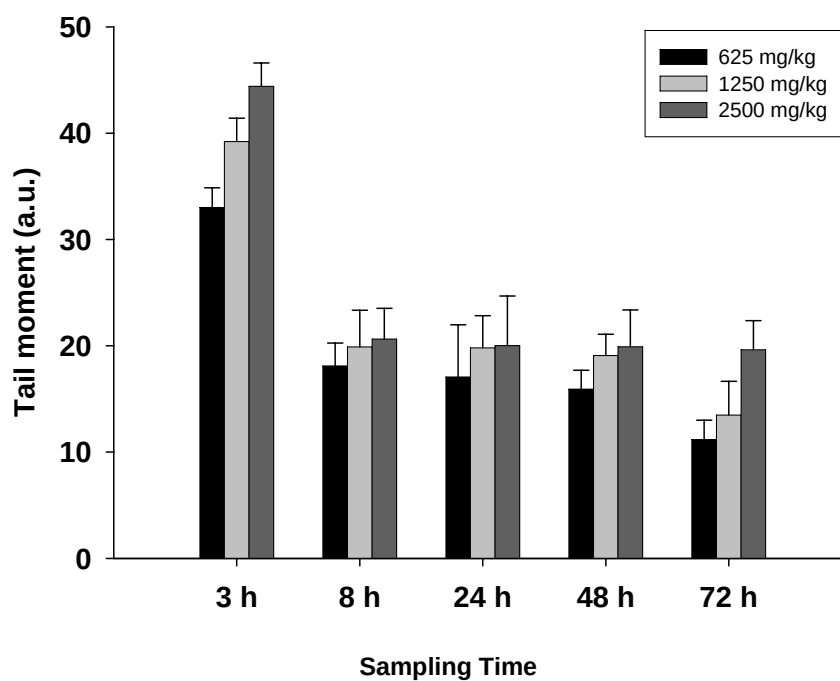


Figure 11. Dose-dependency in tail moment of liver of mice treated with 2-BP in each sampling time

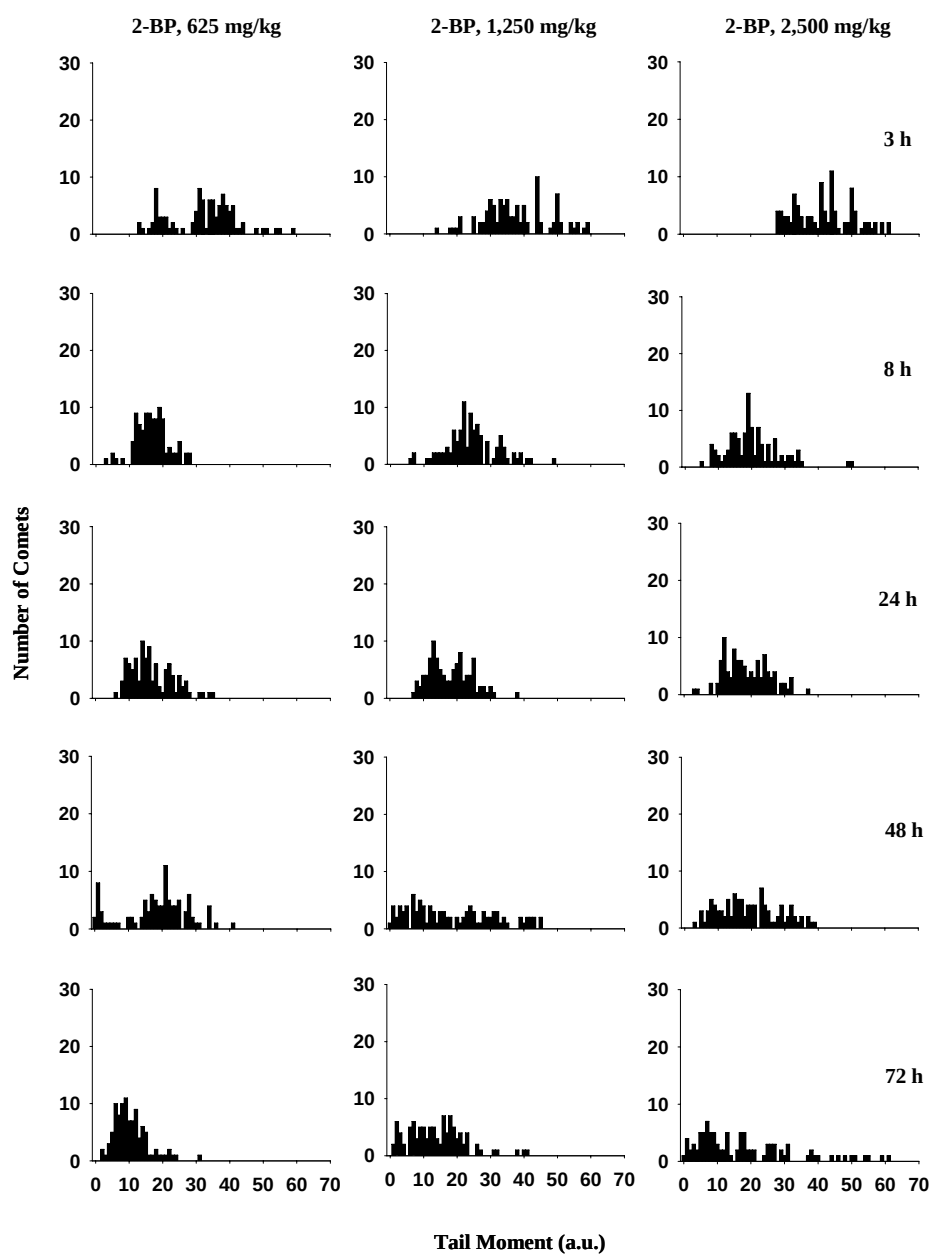


Figure 12. Representative tail moment distributions of liver cells after 2-BP treatment

2. 마우스 골수세포에서의 소핵유발빈도

2-BP를 농도별로 복강내 투여하였던 위와 동일한 마우스의 골수세포에서 관찰한 소핵유발빈도는 Table 4와 같았다.

투여후 24시간 후 및 48시간 후 채취한 골수세포에서의 소핵빈도는 24시간군의 경우 모든 농도군에서의 빈도가 음성대조군의 빈도 (0.12 %)보다 다소 상승한 수치를 나타내었으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 48시간군에서도 모든 농도군에서의 빈도가 음성대조군의 빈도 (0.21%)와 비교할 때 차이를 나타내지 않았다. 즉 2-BP 투여에 의한 마우스 골수세포에서의 소핵유발은 관찰되지 않았다.

Table 4. The frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by 2-BP

Chemical (mg/kg)	Treatment time (h)	MNPCEs/PCEs Mean $\pm$ SD (%)
Negative control	24	0.12 $\pm$ 1.66
	48	0.21 $\pm$ 0.08
2-BP 625 mg/kg	24	0.19 $\pm$ 0.13
	48	0.22 $\pm$ 0.04
2-BP 1,250 mg/kg	24	0.26 $\pm$ 0.15
	48	0.24 $\pm$ 0.06
2-BP 2,500 mg/kg	24	0.25 $\pm$ 0.08
	48	0.25 $\pm$ 0.06
Positive control		
CYP 25 mg.kg	24	2.49 $\pm$ 0.47*

MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocytes

PCE, polychromatic erythrocytes

CYP, cyclophosphamide

3. 흰쥐 간세포에서의 소핵유발

3-1. 동물의 관찰조건

본 연구에서 사용한 Sprague-Dawley계 흰쥐의 군구성시 체중범위는 208.2 - 240.5 g이었다. 군구성에서부터 최종 간세포 분리의 시기까지 동물의 체중변화 양상은 Figure 13과 같았다. 간 부분절제이후 음성대조군의 경우는 체중이 간 절제 4일 후 거의 회복되었으나 2-BP 투여군에서는 회복율이 떨어져 있었다.

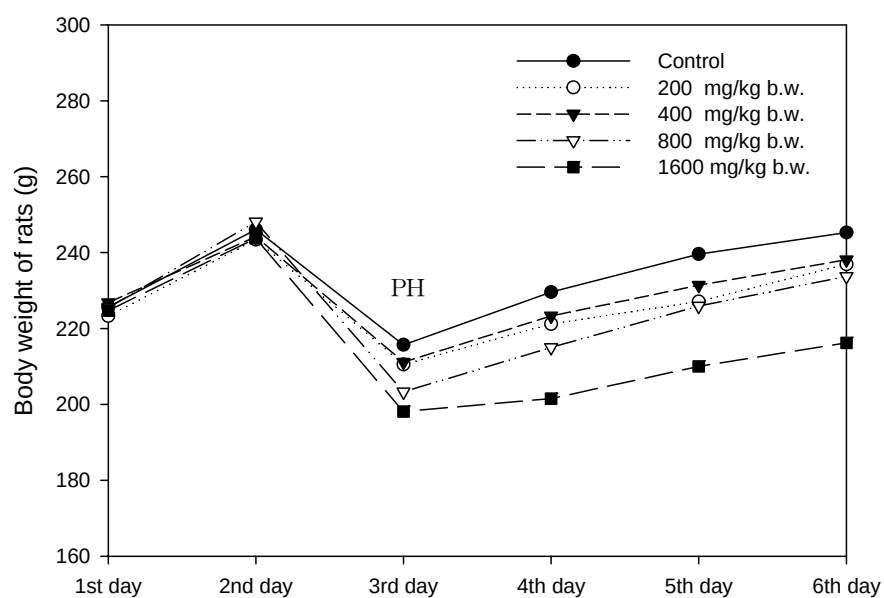


Figure 13. The changes of body weight of 2-BP treated rats before and after partial hepatectomy (PH)

3-2. 간세포에서의 소핵유발빈도

각 실험군에서 분리한 간세포에서의 소핵유발빈도는 Figure 14와 같았다. 모든 투여군에 있어서 양반응성과 함께 소핵유발빈도가 음성대조군에서의 평균빈도 ($0.23 \pm 0.08\%$)보다 통계적으로 유의하게 상승하였음 ($p < 0.05$)을 보여주었다. 이때 400 mg/kg b.w. 투여농도까지 빈도상승양상을 보이다가 그 이상의 농도에서는 그 빈도가 일정하게 유지됨을 나타내었다. 즉 간의 부분절제를 통해 간세포분열을 유도하여 실시한 in vivo의 간세포 소핵시험에서 양성의 결과를 나타내었다.

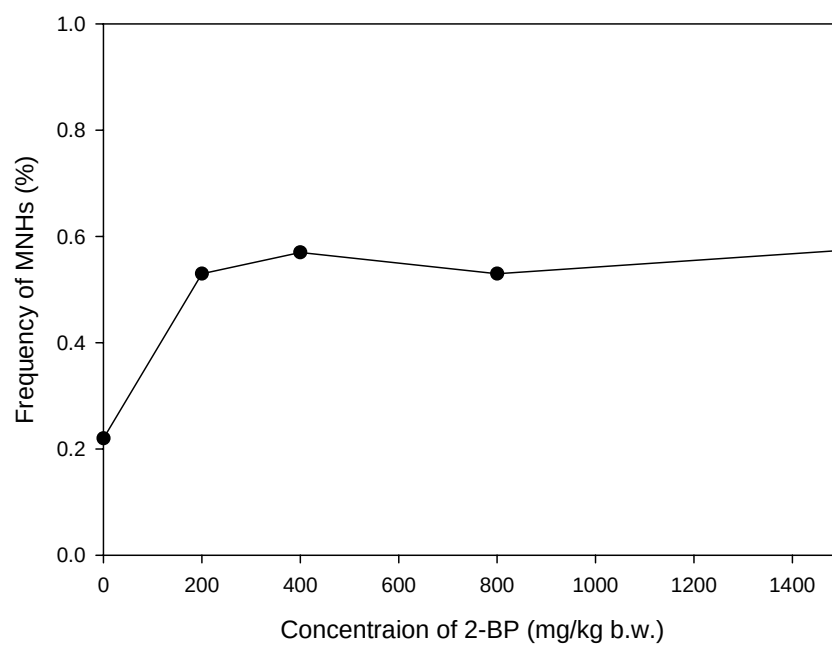


Figure 14. Frequencies of micronucleated hepatocytes (MNHs) in partially hepatectomized rat liver after intraperitoneally injected twice with 2-BP

제 4 장 고 찰

화학물질 등의 발암성을 단기적으로 스크리닝 하고자 하는 목적으로 실시하는 생체내 유전독성시험은 통상 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하고 있다. 이러한 설치류에서의 소핵 유발과 사람의 발암성과의 상관성을 평가하기 위하여 일본의 환경변이원학회 분과회의 연구그룹 (Japanese Environmental Mutagen Society, Mammalian Mutagen Study Group)들이 IARC Group 1, 2 및 2B에 해당하는 사람에서의 확정 혹은 잠재적 발암물질에 대해 마우스 소핵시험을 실시하였다 (Morita *et al.*, 1997). 그 결과, aziridine, bis(2-chloroethyl)화합물, sulfonate 화합물, acyl-type *N*-nitroso 화합물, hydrazine류, aminobiphenyl과 benzidine 유사체, 그리고 azo 화합물의 거의 모든 물질은 조혈세포에서 소핵을 유발하였으나 dialkyl형의 *N*-nitroso 화합물, silica, 금속화합물, 방향족 amine류 및 할로젠 화합물과 호르몬류는 음성으로 나타내는 물질의 수가 많았다.

최근 Sasaki 등 (1997)은 표적장기가 제한되어 있는 소핵시험 대신 설치류의 여러 장기에서 관찰할 수 있는 *in vivo* alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay)를 사용할 것을 제시한 바 있다. 그들은 8가지의 간암유발물질 (auramine, 2,4-diaminotoluene, *p*-dichlorobenzene, *p*-dimethyl aminoazobenzene, ethylene thiourea, styrene-7,8-oxide, phenobarbital sodium, benzene-1,2,3,4,5,6-hexachloride)에 대해 마우스 5개의 표적장기 (간, 폐, 신장, 비장, 골수)에서 위의 방법을 적용한 결과 마우스 골수를 이용한 시험에서 음성이었던 물질들이 benzene-1,2,3,4,5,6-hexachloride를 제외한 모든 물질에서

양성임을 보고하였다. 또한 이들은 소핵시험에서 음성이거나 위양성이었던 6개의 haloalkane 및 haloalkene 류 (1,3-dichloropropene, 1,2-dibromoethane, 1,2-dichloroethane, vinyl bromide, dichloromethane, carbone tetrachloride 및 소핵시험에서 양성이었던 1,2-dibromo-3-chloropropane에 대한 SCGE assay를 실시하였는데 그 결과 표적장기는 달랐지만 모든 물질이 양성의 결과를 나타내었다. 특히 간세포에서 모두 양성의 결과를 나타내었으며 골수세포의 경우는 3개의 물질이 양성의 결과를 나타내었다.

2-BP는 *Salmonella*를 이용한 미생물복귀돌연변이 시험에서 TA100과 TA1535 균주에서 돌연변이를 일으켰으나 포유류 배양세포에서의 염색체이상과 반복투여에 의한 흰쥐 골수세포에서의 소핵 유발에는 영향이 없는 것으로 평가되었다 (Maeng & Yu, 1997). 또한 Ishikawa 등 (2001)은 2-BP를 암컷 마우스에 투여한 후 착상 전 마우스 배자에서 소핵이 형성되었음을 관찰하였었다. 2-BP는 주로 생식계에 영향을 미치는 생식독성물질로서 실험동물에서 난소의 primordial follicle에 있는 난세포를 감소시키고 (Yu *et al.*, 1999) 출산력 감소, 새끼수의 감소, 난소중량감소 및 estrus cycle을 지연시키는 물질로 보고되어 있다 (Lim *et al.*, 1997). 또한 Li 등 (2001)은 2-BP에 폭로된 수컷 흰쥐에서 spermatogenesis동안 germ cell apoptosis를 유발함을 보고하였다. 이러한 결과에서 2-BP가 골수세포에서는 소핵이 관찰되지 않았으나 배자세포에서는 관찰되었음은 소핵시험이 물질에 따른 표적장기의 감수성에 따라 서로 다른 결과를 나타내며, 통상적인 골수세포를 이용한 소핵시험은 시험물질이 표적이 되는 골수세포에 도달하지 않아서 독성 검출이 되지 않는 것도 간과할 수 없는 것으로 생각된다는 기존의 보고와 같은 의미가 있음을 알려주고 있다.

본 연구에서는 설치류 골수에서 소핵 유발을 관찰할 수 없었던 할로젠 화합물의 하나인 2-BP에 대해 SCGE 분석을 통해 DNA 손상을 관찰한 결과, 3,

8, 24, 48 및 72시간의 투여군 모두, 골수세포와 간세포에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다. 특히 간세포에서의 DNA 손상이 골수세포에서 보다 명확한 차이를 나타내었다. 또한 간세포에서의 DNA손상은 2-BP 투여 3시간 후에 가장 높게 관찰되었고, 한편 골수세포에서의 DNA 손상은 2-BP 투여 48시간 후에 가장 높게 관찰되었다. 이러한 결과는 Sasaki 등 (1998)이 2-BP와 구조적 유사물질인 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP)에 대한 결과와 다소 유사하였는데 이들은 DBCP에 대해 여러 표적장기 세포에 대한 DNA 손상을 3시간과 24시간 투여한 마우스에서 관찰한 결과, 간세포의 경우 3시간 투여할 때, 그리고 골수세포의 경우 24시간 투여군에서만 통계적으로 유의한 결과를 보고하였다. 이들이 채택한 농도는 비교적 높은 것 (100 mg/kg)이었으며, 표본채취시간 (투여시간)도 3시간, 24시간만을 관찰한 결과이었다. 그러나 간세포에서의 DNA 손상은 투여 3시간 후에 가장 효과적으로 관찰할 수 있고 골수세포의 경우는 투여 후 시간이 훨씬 지난 뒤에 DNA 손상이 효과적으로 관찰할 수 있었으며 간세포에서의 tail moment 값이 훨씬 높았다는 점을 감안할 때 간장 또한 2-BP의 감수성 있는 표적 장기이었음을 나타내어 주었다.

일반적으로 많은 할로젠 화합물은 간피사, 지방간, 종양을 포함하는 간독성 물질이다 (Snyder & Andrew, 1996). 몇몇 물질들은 주로 신장을 비롯한 장기에서 종양을 일으키기도 한다 (Potot & Dragan, 1996). 할로젠 화합물의 간독성은 쉽게 할로젠이 제거되어 반응성의 대사체를 형성하기 때문에 발생한다. 또한 화합물의 분자에서 할로젠 잔류기 (halogen residue)의 수가 많아지고 용혈 (hemolytic cleavage)이 용이할 때 독성이 커지게 된다 (Snyder & Andrew, 1996). 2-BP와 구조적으로 유사한 DBCP는 CYP450 2E1과 glutathione-S-transferase를 통해 DNA-reactive metabolite로 전환되어지며 전자의 P450 의

해 활성화된 물질인 2-bromoacrolein은 부분적으로 막 확산을 하는 한편 후자의 glutathione에 의한 대사체인 episulfonium 이온은 생존기간이 짧지만 세포막을 뚫지 못한다고 보고되어 있다 (Brunborg *et al.*, 1996; Holme *et al.*, 1989; Soderlund *et al.*, 1995). 즉 수용성 대사체 형성율은 각 장기 특이적인 glutathione-S-transferase isozyme 조성에 따라 다르다는 것을 의미하게 되며, 이러한 기전은 구조가 비슷한 2-BP에 대해서도 동일하다고 생각된다.

일반적으로 화학물질에 의해 일어날 수 있는 유전독성 기전을 유추하면 먼저 직접적으로 돌연변이를 일으키거나 또는 DNA 수복과 발현에 포함된 다양한 효소의 억제됨으로써 그리고 화학물질에 의해 ROS (reactive oxygen species)가 유도되어 DNA 손상을 초래하는 것에 의한다. 2-BP는 Salmonella 균에서 돌연변이를 일으키고, 골수세포에서는 염색체이상을 나타내지 않고 태자세포에서 소핵을 유발하는 물질로 보고되었다 (Maeng & Yu, 1997; Ishikawa *et al.*, 2001). 따라서 본 연구결과에서와 같이 2-BP는 간세포에서 소핵을 유발하며 또한 다양한 농도의 2-BP를 마우스에 투여하였을 때 거의 모든 투여시간에서 tail moment 값이 통계적으로 유의하게 상승함으로써 나타내는 간세포에서의 DNA 손상은 DNA수복효소를 억제함으로 DNA복제와 수복 기전을 바꾸었거나 2-BP에 의해 ROS가 생성됨으로써 나타난 결과라는 가능성을 배제할 수 없다.

Tfazoli 등 (1996)이 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane 및 1,1,3-trichloropropene을 대상으로하여 사람 림프구에서 *in vitro*의 방법으로 소핵 유발과 SCGE분석을 통한 DNA 손상 (DNA single strand break, alkali-labile damage, excision repair site측정을 포함)을 실시한 결과, 소핵시험에 있어서는 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 및 1,1,3-trichloropropene에서 뚜렷한 양

반응관계는 관찰하지 못했으나 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 소핵 유발함을 관찰하였고 1,2,3-trichloropropane의 경우는 유의한 소핵유발을 관찰하지 못했다. 그러나 SCGE분석에서 이물질은 강한 변이원성 활성을 나타내었는데 저자들은 이 결과에 대해 1,2,3-trichloropropane에 대한 소핵시험의 민감성이 비교적 낮은 것은 이 물질로 인해 특정한 손상이 생기는데 이에 대한 세포의 수복능이 유난히 높거나 혹은 너무 심하게 손상된 세포들은 선택적으로 제거되므로 소핵을 형성할 만큼 충분히 생존하지 못하기 때문에 소핵분석시 낮은 비율을 나타낼 수 있음을 제시하였다. 따라서 이와 같은 물질은 소핵시험보다 Comet assay가 더 유용성있는 시험법임을 제기하였다. 즉 이들은 소핵시험에서 명확한 양반응관계를 나타내지 않고 낮은 소핵유발성 즉 변이원성의 활성을 나타낼 경우도 조심스럽게 해석해야 하는데 화학물질의 구조가 세포독성과 관련되는 것과 유전독성과 관련되는 것에 따라 소핵시험의 결과도 달리 나타날 수 있는 가능성을 배제할 수 없다고 하였다.

본 연구에서 대상물질이었던 2-BP의 경우 일반 독성이 매우 낮은 물질이지만 ($LD_{50} > 5,000 \text{ mg/kg}$) 28일 반복투여시험한 경우 골수세포에 세포독성을 나타내었다는 보고 (Maeng & Yu, 1997)를 참고할 때 골수세포에서의 소핵이 유발되지 않았던 결과를 조심스럽게 해석해야 할 필요성이 있으며, 본 연구결과를 통해서도 오히려 2-BP의 유전독성을 스크리닝하기 위해서는 골수를 표적장기로 할 경우 소핵시험보다 SCGE assay가 더 유용함을 알 수 있게 되었다.

Single Cell Gell Electrophoresis (SCGE, Comet assay)는 여러 가지 면에서 주목을 받고 있는 기법으로 화학적 물리적으로 유도된 DNA-strand break, 개개 세포의 DNA의 alkali-labile site, 유도된 DNA 손상의 정도나 세포간 분포 등을 측정하는 아주 빠르고, 간단하고, 민감하며 값싸면서도 신뢰성 있는 방법으로 인정되고 있다. 이 기법의 응용범위도 넓어서 분자 수준의 DNA 손

상이나 이에 대한 세포반응 이라는 기초적인 연구의 도구로서 뿐 아니라 사람 집단을 대상으로 한 역학연구의 도구로도 쓰여지고 있다 (Collins *et al.*, 1997). Comet 기법의 기본적 가정은 그동안 많이 논의되어 왔지만 가장 지지되어 오는 것은, 이 기법에서 보여지는 comet tail은 DNA의 supercoiled 된 것이 느슨해진 것 (relaxed loop)를 뜻하며, tail에서의 loop의 수 (relative tail intensity)가 DNA분절의 수를 지시한다는 것이다.

Alkaline comet assay는 염기산화 (base oxidation), DNA의 외사슬분절 (single DNA strand breakage, SSB)을 감지하는 매우 유효하다. 그러나 어떤 유전독성물질에 의해 생겼던 DNA 병변은 생리적으로 빠르게 수복되므로 그다지 중요한 치명적 혹은 변이원적 병변 현상으로 나타나지 않게 된다. 즉 많은 유전독성 물질들이 직접적으로 DNA 사슬의 분절을 나타내기는 어렵게 된다. Alkaline comet assay에서는 유전독성물질에 의해 alkali에 민감한 (alkali-labile) AP site를 만들어 내고 DNA가 높은 pH의 전기영동액에 있는 동안 이 부위가 분절로 나타나게 된다. 더욱이 분절현상은 세포가 base excision, nucleotide excision를 통해 병변을 수복시킬 때에도 일시적으로 존재하게 되므로 comet assay에서 분절이 높은 수준으로 나타나는 것은 높은 DNA손상정도뿐 아니라 효율적인 수복정도도 지시하는 것이 된다 (Collins *et al.*, 1997). 따라서 유전독성물질의 영향을 나타내거나 증폭시키기위해 DNA 분절을 만들어내는 세포 수복 작용을 이용하는 연구 등에서도 활용되어지기도 하며, DNA 수복효소에 의해 DNA손상이 수복되는 정도와 수복율을 측정하거나 항산화물질 등에 의한 DNA 손상억제 등을 측정할 때에도 활용되기도 한다 (Jekinson *et al.*,1999).

인구집단을 대상으로 한 SCGE assay에 대한 보고를 살펴보면 주로 식이방어요인평가, 임상적 약물노출 그리고 직업적, 환경적, 그리고 lifestyle에서의 발

암물질 노출을 평가할 때 이러한 SCGE assay를 적용하였는데 Rojas (2000) 및 Kassie 등 (2000)에 따르면 과거 연구 75개 보고의 80%가 양성의 결과이었으며 음성적 결과를 나타낸 경우의 대상물질은 DDT, 유기용제, 1,3-butadiene, radioisotope 생산, 머리염색약 등이었다. 한편, 22개의 연구를 대상으로 조사했을 때 이중 50%가 다른 endpoint 즉 약물의 혈청농도, 흡연에서의 기타 세포유전적 endpoint와 상관관계를 나타내었다. 그러나 서로 형성기전이 다르므로 SCGE assay와 다른 유전독성 측정방법과의 상관관계가 모든 화학물질에 대해 매우 의미있게 나올 것이라고는 기대할 수는 없다고 하였다.

사람집단의 모니터링을 위해 SCGE assay를 적용하는 것에 대해서는 아직도 논의가 되고 있지만 방법이 신뢰성이 있으며 재현성이 있는 것으로 간주되고 있다. 가장 큰 장점은 환경에서 유전독성물질과 직접 접촉되는 신체의 모든 부위의 세포에서 분석이 가능하다는 점이다. Olive 와 Banath (1995)에 의하면 Comet assay에서 측정하는 값 중 tail moment가 DNA 손상과의 상관관계가 높아 사람집단의 모니터링을 위해 기존의 다른 측정방법들과 함께 사용할 수 있는 좋은 지표가 된다고 할 수 있다. 특히 특정 DNA 수복효소를 사용하여 서로 다른 종류이 DNA손상을 알아내거나 수복능력을 평가하기 위해 사용될 수 있는 좋은 도구가 될 수 있다 (Rojas, 2001).

DNA 손상이 세포의 소멸 (cell death)과 장기 독성 (organ toxicity)에 주요한 역할을 하게 되는데 발암성 화학물질의 주된 대사과정이 각각의 장기에 따라 서로 다를 것이라는 것을 감안할 때 같은 실험동물에서 되도록 많은 장기에서 유전독성을 평가하는 것이 화학물질의 안전성 평가를 위한 유용한 정보를 제공해 줄 것으로 판단된다.

SCGE assay (Comet assay)를 정규적인 유전독성시험기법으로 활용하려 하는 국제적 학계 분위기 속에서 일부는 Comet assay의 본질이나 comet 형성에

관련된 물리화학적 현상 등이 완전히 이해되고 여러 연구자들 간에 동의가 필요하다는 의견도 있으나 (Collins *et al*, 1997) 본 기법의 장점으로 인해 1999년 미국 Washington D.C.에서 IWGTP (International Working on Genotoxicity Procedure)에서 OECD 가이드라인에 본 시험법을 도입하기위해 유전독성학자들에 의해 본 Comet assay에 대한 기법의 구체적인 통일화 (harmonization)가 이루어지고 있다 (Tice *et al.*, 2000).

본 연구에서도 할로젠 화합물의 하나인 2-BP에 대해 SCGE assay를 실시하여 유의한 자료를 획득함으로써 *in vivo*의 유전독성시험법으로서의 유용성을 확인하였다.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 화학물질의 폭로에 의한 암 발생의 초기단계 변화인 세포 내 유전독성 및 산화적 손상을 평가하는데 있어서 최근 DNA 손상 등을 스크리닝하는 방법으로서 제기되고 있는 단세포겔 전기영동분석법 (Single cell gel electrophoresis, 일명 comet assay)의 유용성을 검토하고 기존의 대표적인 *in vivo* 유전독성시험법인 설치류를 이용한 소핵시험 결과와 표적장기에 따라 비교검토하기 위하여, 생식독성물질이며 유전독성물질인 할로젠 화합물 2-bromopropane (2-BP)을 택하여 배양세포와 실험동물에 투여, 각 시험법을 실시하였는데 그 결과는 다음과 같았다.

1. *In vitro* 실험에서 배양한 혈구세포에서 2-BP를 1시간 투여한 결과 2.5 mM 농도에서 약 30%의 세포독성을 나타내어 2.5, 0.25, 0.1, 0.05 및 0.01 mM의 투여농도로 SCGE 분석을 실시한 결과, 2-BP를 투여한 혈구세포에서의 tail moment 값은 대조군의 것에 비해 통계적으로 유의한 수치를 나타내었으며 ($p < 0.05$) 농도 증가에 따른 양 반응성도 나타내었다.
2. *In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 골수세포에서 SCGE 분석을 실시한 결과 모든 농도단계에 있어서 투여시간 48시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내었으며 72시간에 이르면 tail moment 값이 다시 감소하는 양상을 보여 DNA수복이 이루어져 감을 제시하여 주었다. 또한 각 농도 단계별로 보았을 때 거의 모든 시간군에 있어서 농도에 따른 양 반응성을

나타내었다.

3. *In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 간세포에서 SCGE분석을 실시한 결과 모든 농도단계에 있어서 투여시간 3시간 군에서 가장 높은 tail moment 값을 나타내었으며 3시간 이후로는 DNA수복으로 인해 tail moment 값이 감소하여 가는 양상을 나타내었다. 또한 각 농도 단계별로 보았을 때 거의 모든 시간 군에 있어서 농도에 따른 양 반응성을 나타내었다.
4. *In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 마우스 골수세포에서의 소핵유발빈도는 24시간 및 48시간군의 모든 농도 투여군에서 음성대조군에 비하여 소핵유발 빈도 차이가 관찰되지 않았다.
5. *In vivo*에서 2-BP를 복강 내 투여한 흰쥐 간세포에서의 소핵유발빈도는 모든 투여군에 있어서 음성대조군에서의 것보다 통계적으로 유의하게 상승하였는데 ($p < 0.05$) 이때 400 mg/kg까지 빈도상승양상을 보이다가 그 이상의 농도에서는 그 빈도가 일정하게 유지되는 양상을 나타내었다. 즉 간의 부분 절제를 통해 간세포분열을 유도하여 실시한 *in vivo* 간세포 소핵시험에서 양성의 결과를 나타내었다.

이상의 결과에 따르면 2-BP의 발암성 및 유전독성을 스크리닝하기 위하여 SCGE 분석법 (일명 Comet assay)이 소핵시험보다 더 유용성 있는 것으로 검토되어, 본기법의 유전독성시험법으로서의 유용성을 확인하였다. 또한 유사한 할로젠화합물의 노출 근로자 스크리닝에 대한 본 기법의 활용성을 나타내었다.

한편, 2-BP의 표적장기로서 생식계 뿐 아니라 간장도 감수성이 있는 표적장기를 검토하였다.

제 6 장 참고문헌

- Anderson, D., Yu, T-W. and Phillips, B.J., Schmerzer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307: 261-271.
- Benning, V., Pasquet, J.P., Thybaud, C., Melcion, C. and Cordier, A. (1992). Carcinogen/noncarcinogen in mouse hepatocyte micronucleus test. *Mutat. Res.* 271: 159-160.
- Blocki, F.A., Logan, M.S.P., Baoli, C. and Wackeh, L.P. (1994). Reaction of rat liver glutathione S-transferase and bacterial dichloromethane dehalogenase with dihalomethanes. *J. Biol. Chem.* 269: 8826-8830.
- Brunborg, G., Sonderlund, E.J., Holme, J.A. and Dybing, E. (1996). Organ-specific and transplacental DNA damage and its repair in treated with 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Chem.-Biol. Interact.* 101: 33-48.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L. (1993). Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.
- Fortni, P., Raspaglio, G., Falchi, M. and Dogliotti, E. (1996). Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis* 11: 169-175.
- Gedik, C.M., Ewen, S.W.B. and Collins, A.R. (1992). Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in

human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 62: 313-320.

Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.* 105: 253-256.

Herens, C., Massart, S., Bouzahzah, B., Koulischer, L. and Barbason, H. (1995). Nuclear lesions during rat hepatocarcinogenesis. II. Measuring the micronuclei during initiation, promotion and progression of rat hepatocarcinogenesis induced with diethylnitrosamine. *Mutat. Res.* 329: 161-171.

Holme, J.A., Sonderlund, E.J., Brunborg, G., Omichinski, J.G., Bekkedal, K., Trygg, B., Nelson, S.D. and Dybing, E. (1989). Different mechanism are involved in DNA damage, bacterial mutagenicity and cytotoxicity induced by 1,2-dibromo-3-chloropropane in suspensions of rat liver cells. *Carcinogenesis* 10: 49-54.

Invanetich, K.M. and Van Den Honert, L.H. (1981). Chloroethanes : their metabolism by hepatic cytochrome P-450 in vitro. *Carcinogenesis* 2: 697-702.

Ishikawa, H., Tian, Y., Yamauchi, T. (2001). Induction of micronuclei formation in preimplantation mouse embryos after maternal treatment with 2-bromopropane. *Reprod. Toxicol.* 15: 81-85.

Jekinson, A.M., Collins, A.R., Duthie, S.J., Wahle, K.W.J. and Duthie, G.G. (1999). The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *FASEB J.* 13: 2138-2142.

Kassie, F., Parzefall, W. and Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay : a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463: 13-31.

Kim, Y.H., Jung, K., Hwang, T., Jung, G., Kim, H., Park, J., Kim, J., Park

J., Park, D., Park, S., Choi, K. and Moon, Y. (1996). Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. *Scand. J. Work Environ. Health* 22: 387-391.

Koh, J.M., Kim, C.H., Hong, S.K., Lee, K.U., Kim Y.T., Kim, O.J. and Kim, G.S. (1998). Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. *Eur. J. Endocrinol.* 138: 554-556.

Li, G.X., Kang, K.S. and Lee Y.S. (2001). 2-Bromopropane induced germ cell apoptosis during spermatogenesis in male rat. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 373-382.

Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J.H., Chung, Y.H., Kim, T.G., Park, J.H., Moon, Y.H. and Yu, I.J. (1997). Effects of 2-bromopropane on the female reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Ind. Health* 35: 278-284.

Maeng, S.H. and Yu, I.J. (1997). Mutagenicity of 2-bromopropane. *Ind. Health* 35: 87-95.

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M., Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288: 47-63.

Morita, T., Asano, N. Awogi, T, Sasaki, Y.F., Sato, S., Shimada, H. Sutou, S., Suzuki, T., Wakata, A., Sofuni, T. and Hayashi, M. (1997). Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutat. Res.* 391: 259-267

National Toxicology Program (1993). Toxicology and carcinogenesis studies of 1,2,3-trichloropropane (CAS No. 96-18-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage studies). NTP TR 384. NTP. Research Triangle Par. N.C.

Noguchi, T., Asakura, M., Sugiyama, T. and Matsushima, T. (1994). N-Nitroso-di-n-propylamine induces micronuclei in partially hepatectomized

rat liver but not in mouse bone marrow cells. *MMS com.* 2: 79-82.

OECD guidelines for testing of chemicals (1997). TG No. 474.

Olive, P.L. and Banath J.P. (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.* 294: 275-283.

Olive, P. and Banath, J.P. (1995). Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp. Cell Res.* 221: 19-26.

Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.

Park, J.S., Kim, Y.H., Park, D.W., Choi, K.S., Park, S.H., Moon, Y.H. (1997). An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents containing 2-bromopropane in an electronic factory, south Korea: epidemiological survey. *J. Occup. Health* 39: 138-143.

Potot, H.C. and Dragon, Y.P. (1996). Chemical carcinogenesis, in: C.D. Klassen(Ed.), Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, 5th ed. McGraw-Hill, New York, pp 201-267.

Rojas, E., Valverde, M., Lopez, M.C., Naufal, I., Sanchez, I., Bizarro., P., Lopez, I., fortoul, T.I. and Ostrosky-Wegman, P. (2000). Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 468: 11-17.

Sasaki, Y.F., Izumiyama, F., Nishidate, E., Matsusaka, N. and Tsuda, S. (1997). Detection of genotoxicity of rodent carcinogens targeting the liver by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay) in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow). *Mutat. Res.* 391: 201-214.

Sasaki, Y.F., Saga, A., Akasaka, M., Ishibashi, S., Yoshida, K., Su, Y.Q., Matsuakas, N. and Tsuda, S. (1998). Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutat. Res.* 419: 13-20.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

Singh, N.P., Danner, D.G., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237: 123-130.

Snyder, R. and Andrew, L.S. (1996). Toxic effects of solvents and vapors, in: C.D. Klassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, 5th ed. McGraw-Hill, New York, 737-772.

Sonderlund, E.J., Meyer, D.J., Betterer, B., Nelson, S.D., Dybing, E. and Holme, J.A. (1995). Metabolism of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) by glutathione S-transferase. *Chem.-Biol. Interact.* 97: 257-272.

Storer, R.D., Cartwright, M.E., Cook, W.O., Soper, K.A. and Nichols, W.W.(1995). Short-term carcinogenesis bioassay of genotoxic procarcinogens in PIM transgenic mice. *Carcinogenesis* 16: 285-293.

Tafazoli, M. and Kirsch-Volders, M.(1996). In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 371: 185-202.

Tates, A.D., Broerse, J.J., Neuteboom, I. and de Vogel, N. (1982). Differential persistence of chromosomal damage induced in resting rat-liver cells by X-rays and 4,2-MeV neutrons. *Mutat. Res.* 92: 275-290.

Tennant, R.W. and Ashby, J. (1991). Classification according to chemical structure, mutagenicity to salmonella and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.* 257: 209-227.

The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1990). Single versus multiple dosing in the micronucleus test: The summary report of the collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutat. Res.* 234: 205-222.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Harmann, A., Kobayahi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.

Weisburger, E.K. (1997). Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 21: 7-16.

Yu, I.J., Chung, Y.H., Lim, C.H., Maeng S.H., Lee, J.Y., Lee S.J., Kim, C.H., Kim, T.G., Lim C.H., Park J.S. and Moon Y.H. (1997). Reproductive toxicity of 2-bromopropane in Sprague-Dawley rats. *Scand. J. Work. Environ. Health* 23: 144-149.

본 연구보고서에 기재된 내용은 연구책임자의
개인적 견해이며, 우리 공단의 공식견해가 아님
을 알려드립니다.

한국산업안전공단 이사장

산업화학물질의 발암성 스크리닝을 위한 유전독성연구
(연구원 2003-3-14)

발 행 일 : 2002년 12월 31일

발 행 일 : 산업안전보건연구원 원장 정 호 근

연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터 선임연구원 맹 승 희

발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100 - 842

F A X : (032) 5180 - 867
